

# 测定节肢动物捕食者与猎物关系的 A 蛋白 双抗体夹心酶联免疫吸附技术 \*

刘红玉      陈常铭      江汉华

(湖南农业大学植保系 长沙 410128)

酶联免疫吸附技术 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是 70 年代才发展起来的血清学技术, 目前在昆虫生态学和生物防治研究中有大量的研究报道<sup>[1-8]</sup>, 研究发现其灵敏度和特异性都远远高于其它血清学方法, 如毛细管环状沉淀法 (capillary ring test, CRI), 凝胶双扩散法 (double diffusion test, DDT) 和对流免疫电泳 (cross-over immuno-electrophoresis, COIEP), 而且检测速度快, 适于田间大规模检测。ELISA 主要有直接法 (direct method)、间接法 (indirect method)、双抗体夹心法 (double antibody sandwich method) 和 A 蛋白双抗体夹心法 (protein A double antibody sandwich method), 其中 A 蛋白双抗体夹心法在昆虫学研究中尚未见报道。

本项研究以检测茶园捕食性天敌对茶二岔蚜 *Toxoptera aurantii* (Boyer)、茶尺蠖 *Ectropis obliqua* (Warren) 的捕食作用, 探讨 A 蛋白双抗体夹心酶联免疫吸附法 (PAS-ELISA) 中各参数的最适宜条件, 并从灵敏度及特异性方面与 DDT, COIEP, I-ELISA 法进行比较。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试虫源

茶二岔蚜无翅成虫、茶尺蠖幼虫、捕食性天敌, 均采自湖南农大茶场。

### 1.2 试剂

A 蛋白纯品、辣根过氧化物酶联 A 蛋白从上海生化所购买。其中 A 蛋白是从一些金黄色葡萄球菌细胞壁上提取的一种蛋白成分, 能与人及多种哺乳动物血清 IgG 分子的 Fc 段非特异性结合, 抗体分子的 Fab 部位仍保持免疫活性。利用 A 蛋白的这种特性, 将它作为载体参与反应。

### 1.3 抗原的制备

将采集的茶二岔蚜、茶尺蠖在室温下饥饿 24 h 后, 分别用蒸馏水洗净, 加等体积生理盐水磨成匀浆, 用过磷酸缓冲液 (pH 7.2) 于 4℃ 下抽提, 离心 (3 500 r/min) 15 min, 取上清液经二层镜头纸、普通滤纸、细菌过滤器 ( $\Phi 0.22 \mu$ ) 过滤, 滤液于 PBS 缓冲液中 4℃ 下透析 2 d, 再用饱和蔗糖溶液浓缩, 在 721 分光光度计下测其蛋白质含量, 测得茶二岔蚜为 5 mg/mL、茶尺蠖为 5.3 mg/mL。分装于灭过菌的安培瓶中, 冰冻保存作为抗原。

### 1.4 抗血清的制备

参考 Miller<sup>[6]</sup>, 免疫剂量从 1.25 mg/只, 逐渐递增至 3.5 mg/只, 依次采用多点皮下、肌肉、静脉

\* 国家自然科学基金资助项目

1995-01-03 收稿, 1995-03-15 收修改稿

注射三种免疫途径,经63 d 免疫,采血抽提抗血清,测得效价为 $1.02 \times 10^6$  (I-ELISA 法)。

## 1.5 捕食性天敌的处理

将采集的天敌狼蛛 *Lycosa* sp.、跳蛛 *Bianor* sp.、猫蛛 *Oxyopes* sp.、臭步甲 *Pheropsophus* sp.、龟纹瓢虫 *Propylea japonica* (Thunberg) 和步甲 *Calosoma* sp., 每一种的一部分饥饿致死, 取其消化道将内容物涂布于硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 冰冻干燥保存, 作为阴性对照; 另一部分取其消化道内容物涂于 NC 膜上, 冰冻干燥保存, 作检测用。检测时, 将 NC 膜剪碎, 用 300  $\mu$ L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4, 0.02 mol/L) 浸提, 4  $^{\circ}$ C 下过夜, 次日摇匀, 静置数分钟, 取上清液检测。

## 1.6 血清学方法

共采用了4种血清学方法: 凝胶双扩散法<sup>[9]</sup>、间接酶联免疫吸附法<sup>[3]</sup>, 对流免疫电泳<sup>[6]</sup>和 A 蛋白双抗体夹心酶联免疫吸附法。PAS-ELISA 的测试程序如下:

(1) 将 A 蛋白纯品用碳酸盐缓冲液 (pH 9.6, 0.1 mol/L) 稀释, 包被40孔酶联板, 100  $\mu$ L/孔, 4  $^{\circ}$ C 下过夜, 次日用磷酸盐缓冲液 (pH 7.4, 0.02 mol/L) 洗板3次。(2) 加第一抗血清 (用含0.2 %牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液稀释, 100  $\mu$ L/孔, 37  $^{\circ}$ C 水浴2 h, 洗板3次)。(3) 加抗原或天敌消化道内容物抽提液, 100  $\mu$ L/孔, 37  $^{\circ}$ C 水浴2 h, 洗板3次。(4) 加第二抗血清, 同 (2)。(5) 加辣根过氧化物酶联 A 蛋白 (HRP-Protein A) 用含0.2 %牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液稀释, 100  $\mu$ L/孔, 37  $^{\circ}$ C 水浴2 h, 洗板3次。(6) 加底物溶液 (邻苯二胺4 mg, 柠檬酸-磷酸盐缓冲液10 mL,  $H_2O_2$ 15  $\mu$ L), 100  $\mu$ L/孔, 37  $^{\circ}$ C 水浴30 min。(7) 加2 mol/L  $H_2SO_4$ , 25  $\mu$ L/孔, 终止反应, 2 min 后在酶联仪上492 nm 处测 OD 值, 求出阴性对照 OD 值的平均值  $\bar{N}$ , 若样品 OD 值  $P \geq 2\bar{N}$ , 则视为阳性反应, 否则为阴性反应。

## 2 结果与分析

### 2.1 A 蛋白最适包被浓度的测定

将 A 蛋白纯品稀释成2.5、2.0、1.5、1.0  $\mu$ g/mL, 分别与倍比稀释的茶二岔蚜抗原反应, 第一、二抗体分别用5 000、1 000倍稀释的抗血清, 用正常血清和缓冲液作阴性对照进行 PAS-ELISA 试验。结果 (图1) 显示: A 蛋白包被浓度在1.5~2.5  $\mu$ g/mL 范围内, 均能取得较满意的结果。其中以 B 线的2  $\mu$ g/mL 浓度最好, 因为反应的 OD 值随抗原浓度变化的曲线陡度最大, 阳性、阴性 OD 值的比值大, 使判断结果更准确。

### 2.2 第一、第二抗体最适工作浓度的选择

将茶二岔蚜抗血清稀释成 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 和 $10^{-5}$ 浓度作为第一抗体, 该抗血清稀释作第二抗体, A 蛋白2  $\mu$ g/mL 包被酶联板, 茶二岔蚜抗原10  $\mu$ g/mL, 正常血清2 000倍稀释作为阴性对照, 进行 PAS-ELISA 试验。结果 (图2) 显示: 第一抗体稀释成 $10^{-2}$ ~ $10^{-4}$ 都可以, 但以 $10^{-4}$ 最合适, 因此时曲线陡度最大, 本底值最低, 非特异性反应最弱。当第一抗体浓度为 $10^{-4}$ 时, 第二抗体浓度以 $10^{-3}$ 为好。此浓度下 OD 值较高, 为1.10左右, 浓度再升高10倍, OD 值上升不多, 而浓度降低10倍时, OD 值下降幅度较大, 因此第一、二抗体分别以 $10^{-4}$ 、 $10^{-3}$ 较好。

### 2.3 灵敏度及特异性测定

用 A 蛋白2  $\mu$ g/mL 包被酶联板, 第一、二抗体为 $10^{-4}$ 、 $10^{-3}$ 倍稀释的茶二岔蚜抗血清, 茶二岔蚜、茶尺蠖抗原分别作倍比稀释后进行 PAS-ELISA 试验, 以缓冲液作阴性对照, 结果见图3。从图中可以看出呈阳性反应的抗原最大稀释倍数为 $10^{-5}$ , 此时抗原的浓度, 也即 PAS-ELISA 的灵敏度为: 500  $\mu$ g/mL

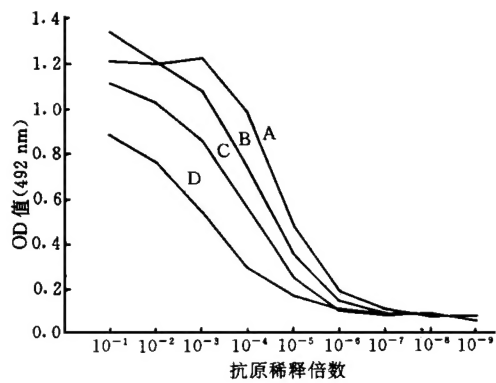


图1 不同 A 蛋白包被浓度对 OD 值的影响  
A、B、C、D 分别示 A 蛋白包被浓度为  
2.5、2.0、1.5、1.0  $\mu\text{g/mL}$

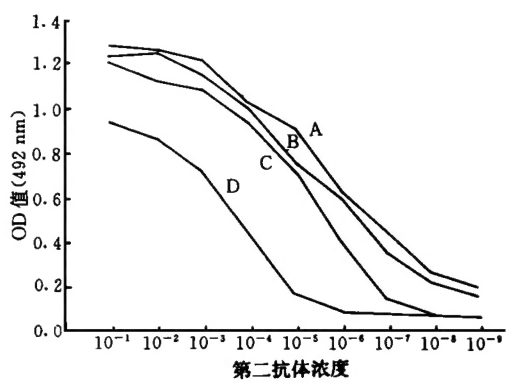


图2 第一抗体 OD 值随第二抗体浓度变化的曲线  
A、B、C、D 分别示第一抗体浓度为  
 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 和 $10^{-5}$

$\times 10^{-5} = 0.05 \mu\text{g/mL}$ 。茶尺蠖抗原与茶二岔蚜抗血清反应的 OD 值在阳性反应标准线以下，说明茶二岔蚜抗血清未与茶尺蠖抗原发生交叉反应。作者还将茶二岔蚜抗血清与黑刺粉虱 *Aleurocanthus spiniferus* (Quaint) 抗原，饥饿致死的天敌消化道内容物进行 PAS-ELISA 试验，结果都为阴性反应，且本底值低，为 0.113 左右，由此可见 PAS-ELISA 特异性好。

2.4 四种血清学方法比较

在进行 PAS-ELISA 法测定的同时，用茶二岔蚜同一抗血清对其它三种血清学方法 DDT、COIEP 和 I-ELISA 进行了最适工作条件、灵敏度及特异性测定。

(1) DDT 结果 (表1) 显示：抗血清稀释 40~80 倍，抗原稀释 5~10 倍时，反应最强，沉淀带最清晰。当抗血清稀释 80 倍，能出现可见沉淀带的抗原最高稀释倍数为 80，此时抗原的蛋白质浓度为： $5\,000/80 = 62.5 (\mu\text{g/mL})$  (标准抗原浓度为  $5 \text{ mg/mL}$ )，即 DDT 灵敏度为  $62.5 \mu\text{g/mL}$ 。对 DDT 的特异性试验表明：茶二岔蚜抗血清与黑刺粉虱、茶尺蠖及跳蛛阴性样本均有不同程度的交叉反应。

表1 茶二岔蚜抗原与其抗血清的 DDT 试验结果

抗原稀 释倍数	抗血清稀释倍数						
	20	40	80	160	320	640	1 280
1	++	+++	+++	+++	++	+	+
5	+++	+++	+++	+++	++	+	+
10	+++	+++	+++	++	++	+	+
20	++	++	++	+	+	+	-
40	+	+	+	+	-	-	-
80	+	+	+	-	-	-	-
160	-	-	-	-	-	-	-

+++ 沉淀弧粗，反应强；+ 沉淀弧细，反应弱；++ 沉淀弧较粗，反应较强；- 无沉淀弧出现

(2) COIEP 试验结果 (图4) 表明：在 pH 8.6，离子强度 0.05 的硼酸缓冲液中电泳，抗原带负电荷，移向正极，抗体带正电荷，移向负极，在抗原、抗体孔间适宜的位置形成非常清晰的沉淀带，抗血清可不经稀释直接使用。呈阳性反应的茶二岔蚜抗原最大稀释倍数为 128 倍，此时抗原浓度 (即灵敏度) 为：

5 000/128=39 ( $\mu\text{g/mL}$ )。特异性试验显示：茶二岔蚜抗血清与高浓度的黑刺粉虱抗原呈阳性反应，该抗原经适当稀释约为300  $\mu\text{g/mL}$  时转为阴性反应，与蜘蛛阴性样本反应时，未出现可见沉淀带。

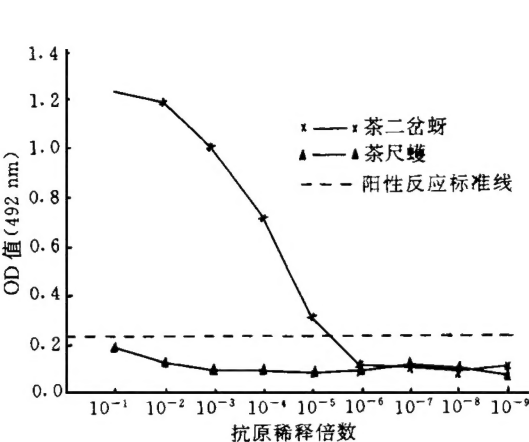


图3 茶二岔蚜、茶尺蠖抗原系列稀释与茶二岔蚜抗体反应的 OD 值曲线

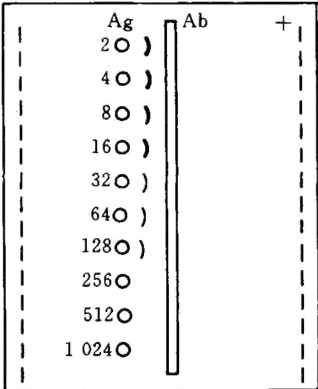


图4 对流免疫电泳测定结果图  
Ag 抗原；Ab 抗体

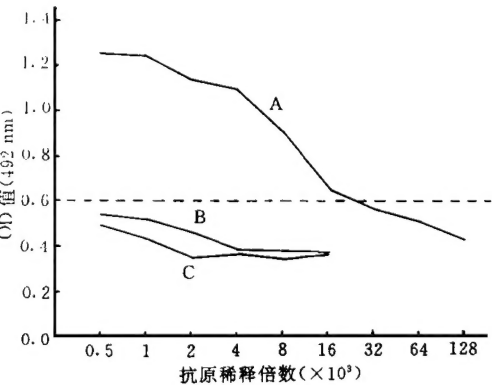


图5 三种抗原与茶二岔蚜抗血清反应 OD 值曲线

A、B、C 分别示茶二岔蚜、黑刺粉虱、茶尺蠖抗原；虚线为阳性反应标准线

茶尺蠖抗血清进行单头测试，结果表2显示：所检测的天敌对茶二岔蚜、茶尺蠖都有捕食作用，但捕食率不一样，茶尺蠖的阳性率明显高于茶二岔蚜，这可能与猎物密度有关。根据种群密度随季节的消长关系，茶二岔蚜为前期高峰型，种群密度仅在春季出现高峰，以后急剧下降，因此到采集天敌样本（9月上旬至11月中旬）时，茶二岔蚜数量少，天敌捕食作用低，阳性率低。茶尺蠖属阶梯上升型，种群密度逐渐增大，采样时达高峰，天敌容易搜寻，故阳性率也高。室内饲养实验证实：天敌对茶二岔蚜、茶尺

(3) I-ELISA 法最适工作条件为：抗原包被浓度 10  $\mu\text{g/mL}$ ，抗血清 8 000 倍稀释，能检测的最低抗原浓度为 0.3125  $\mu\text{g/mL}$ 。特异性检验中，茶二岔蚜抗血清虽未与黑刺粉虱、茶尺蠖抗原呈阳性反应，但 OD 值已十分接近阳性标准值 0.600 (以  $P \geq 1.5\bar{N}$  为阳性标准)，本底值高，为 0.404 左右 (图5)，抗血清经提纯去杂质，可降低本底值，减少非特异性反应。

综上所述，从灵敏度、特异性及检测速度来看，PAS-ELISA 最好，其次是 I-ELISA 和 COIEP，DDT 最差。COIEP、DDT 简单，不需要特殊的仪器设备，但一次检测的样品数有限，重复性也不太好。PAS-ELISA 和 I-ELISA 一次能检测几十个样品，重复性好，适于田间大规模检测，且 PAS-ELISA 本底值低，非特异性反应弱，因此，PAS-ELISA 是一种很有发展潜力的好方法。

2.5 茶二岔蚜、茶尺蠖的捕食性天敌检测

将天敌消化道内容物浸提液分别与茶二岔蚜、

螋都有捕食作用。说明 PAS-ELISA 法可行。

表2 天敌对茶二岔蚜、茶尺蠖的 PAS-ELISA 阳性率

天敌种类	检测头数	茶二岔蚜		茶尺蠖	
		阳性数	阳性率	阳性数	阳性率
狼 蛛	15	1	0.067	7	0.467
跳 蛛	28	10	0.357	14	0.500
猫 蛛	30	4	0.133	10	0.333
臭 步 甲	6	3	0.500	4	0.667
龟纹瓢虫	7	5	0.714	5	0.714
步 甲	9	2	0.222	1	0.111

### 3 小 结 论

在害虫的综合防治上,酶联法的探讨是一较活跃的领域。Service Voller 与 Bidwell, Crook 与 Payne 对直接法、间接法和双抗体夹心法进行了比较研究,发现这三种方法中,间接法的灵敏度较高而双抗体夹心法的特异性较好<sup>[8,10]</sup>。从作者的研究结果中发现: PAS-ELISA 综合了二者优点,即较高的灵敏度和较好的特异性,又省去了双抗体夹心法中制备特异性酶联抗体(同种动物双抗体夹心法)或制备多种动物抗血清(异种动物双抗体夹心法)的麻烦,使试验简化,具有更广泛的实用价值。

在天敌对害虫捕食作用的定量评价方面, Dempstre<sup>[11]</sup>, Boreham<sup>[12]</sup>, 周汉辉<sup>[9]</sup>、汤鉴球<sup>[13]</sup>、张文庆<sup>[14]</sup>等曾作过报道,本文未能涉及,有待进一步探讨。

### 参 考 文 献

- 1 黄葵等. 应用酶联免疫吸附法鉴定粘虫的捕食性天敌. 植物保护学报, 1992, 3: 207~211
- 2 Boreham P F L. Recent developments in serological methods for predator-prey studies. Entomological Society of America Miscellaneous Publication, 1979, 11: 17~23
- 3 Fichter B L, Stephen W P. Selection and use of hostspecific antigens. Entomological Society of America Miscellaneous Publication, 1979, 4: 25~33
- 4 Greenstone M H. An enzyme-linked immunosorbent assay for the *Amboyospora* sp. of *Culex salinarius* (Microspora: Amblyosporidae). Journal of Invertebrate Pathology, 1983, 41: 250~255
- 5 Miller M C. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay of narrow-and broad-spectrum anti-adult southern pine beetle serum. Annals of the Entomological Society of America, 1981, 74: 279~282
- 6 Miller M C, Chappell W A *et al.* Evaluation of immunoelectrophoretic tests using a broad spectrum anti-adult southern pine beetle serum. Ann. Entomol. Soc. Am., 1979, 72: 99~104
- 7 Schoof D D *et al.* Evaluation of predator-prey relationships using an enzyme immunoassay, Ann. Entomol. Soc. Am., 1986, 79: 91~95
- 8 Service M W *et al.* The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the identification of bloodmeals of hematophagous insects. Bulletin of Entomological Research, 1986, 76: 321~330
- 9 周汉辉. 天敌对三化螟的捕食功能的血清法评价. 植物保护学报, 1992, 3: 193~197
- 10 Crook N E, Payne C C. Comparison of three methods of ELISA for baculoviruses. Journal of General Virology. 1980, 46: 29~37
- 11 Dempster J P. A quantitative study of the predators on the eggs and larvae of the broom beetle, *Phytodecta olivacea*

- Forster, using the precipitin test. *J. Anim. Ecol.*, 1960, **29**: 149~167
- 12 Boreham P F L, Ohiagu C E. The use of serology in evaluating invertebrate prey-predator relationships; a review. *Bull. Ent Res.*, 1978, **68**: 171~194
- 13 汤鉴球, 张文庆. 用血清学方法评价稻田狼蛛对稻纵卷叶螟的控制作用. *植物保护学报*, 1992, **1**: 1~5
- 14 张文庆等. 天敌作用定量评价的一种方法, *青年生态学者论丛 (二)*, 1992

## **PROTEIN A DOUBLE ANTIBODY SANDWICH ENZYME- LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (PAS-ELISA) FOR IDENTIFYING THE RELATIONSHIP BETWEEN ARTHROPOD PREDATOR AND PREY**

Liu Hongyu   Chen Changming   Jiang Hanhua

(*Department of Plant Protection, Hunan Agricultural University   Changsha   410128*)